

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 56-011791

(43)Date of publication of application : 05.02.1981

(51)Int.Cl.

C12N 1/06  
// A23L 1/28  
(C12N 1/06  
C12R 1/85  
C12R 1/72  
C12R 1/84  
C12R 1/13  
C12R 1/15 )

(21)Application number : 54-086711

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 09.07.1979

(72)Inventor : UCHI OSAMU  
MATSUDA KOJI

## (54) SELF DIGESTION OF MICROBIAL CELL

## (57)Abstract:

PURPOSE: To control rottenness occurring in self digestion of a living microbial cell with admittable food additives, by treating the living microbial cells with an acid in pH not larger than specific value so that they can be dyed with methylene blue, followed by subjecting them to self digestion.

CONSTITUTION: A living microbial cell is treated with an acid in pH not larger than 2.5 so that it can be dyed with methylene blue, and it is subjected to self digestion. The acid treatment can be carried out at least partly in the presence of sodium chloride in pH not larger than 3.5. An inorganic acid, e.g., hydrochloric acid, phosphoric acid, etc., an organic acid, e.g., acetic acid, citric acid, tartaric acid, etc. may be used as the acid used in the acid treatment. The acid treatment is preferably carried out at low temperatures, usually at 0W40° C, preferably at 5W 30° C. A 5W25wt% suspension of the living microbial cell is made for self digestion and it is kept at 20W50° C with stirring slightly.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56-11791

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 1/06  
// A 23 L 1/28  
(C 12 N 1/06  
C 12 R 1/85  
1/72  
1/84  
1/13  
1/15 )

識別記号

庁内整理番号  
7235-4B  
7110-4B  
6760-4B  
6760-4B  
6760-4B  
6760-4B  
6760-4B

⑭ 公開 昭和56年(1981)2月5日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ 菌体を自己消化させる方法

⑯ 特 願 昭54-86711

⑰ 出 願 昭54(1979)7月9日

⑱ 発 明 者 内理  
鎌倉市台二丁目10-20

⑲ 発 明 者 松田孝二

横浜市緑区田奈町23-4

⑳ 出 願 人 三菱化成工業株式会社  
東京都千代田区丸の内2丁目5  
番2号

㉑ 代 理 人 弁理士 長谷川一 外1名

明 細 書

発明の名称

菌体を自己消化させる方法

特許請求の範囲

- (1) 生菌体を pH2.5 以下で酸処理して、菌体がメチレンブルーで明らかに染色されるに至らしめたのち、pH5-7 で自己消化させることを特徴とする菌体の自己消化法。
- (2) 特許請求の範囲の①項記載の菌体の自己消化法において、菌体の30%以上が染色される状態となつたのち自己消化を行なわせることを特徴とする方法。
- (3) 特許請求の範囲の①項または②項記載の菌体の自己消化法において、生菌体を pH0.5-2.0 で酸処理することを特徴とする方法。
- (4) 生菌体を pH2.5 以下で酸処理し、且つ酸処理の少くとも一部は塩化ナトリウムの存在下に行なつて、菌体がメチレンブルーで明らかに染色されるに至らしめたのち、pH5-7 で

自己消化させることを特徴とする菌体の自己消化法。

- (5) 特許請求の範囲の①項記載の菌体の自己消化法において、菌体の30%以上が染色される状態となつたのち自己消化を行なわせることを特徴とする方法。
- (6) 特許請求の範囲の①項または②項に記載の菌体の自己消化法において、生菌体を pH1-2.5 で酸処理することを特徴とする方法。
- (7) 特許請求の範囲の①項ないし③項のいずれかに記載の菌体の自己消化法において、酸処理を生菌体を酸水溶液に懸濁させたのち遠心分離装置で上澄液と菌体を含むスラリーとに分離し、このスラリーに塩化ナトリウムを添加して所定の pH に保持することにより行なうことを特徴とする方法。

発明の詳細な説明

本発明は菌体を自己消化させる方法に関するものであり、詳しくは自己消化に先立つて菌体に酸処理を施し、菌体に自己消化に必要な酵素

を失活させない限度で変化を起こさせ、同時に他の汚染菌の生活能を停止ないし衰退させて、自己消化中における腐敗を抑制する方法に関するものである。

菌体、特に酵母を自己消化させて酵母エキスを製造することは公知である。このような自己消化法としては、酵母に食塩を高濃度で添加したり、酢酸エチル等の有機溶媒を添加して強制的に原形質分離を生起させ、酵母を泥状化させたのち30〜70℃程度で自己消化を行なわせる方法がある。しかし高濃度の食塩の添加は得られる酵母エキス中の食塩濃度を高めるので好ましいことではなく、また食品添加物でない有機溶媒の使用も本来避けるべきものである。このような難点を解決する方法として、比較的少量の食塩とエタノールを併用する方法が提案されている(特開昭47-61675参照)。

本発明はかかる方法とは異なり、生菌体をPH3.5以下で酸処理するか又はPH3.5以下で酸処理し、且つ酸処理の少くとも一部は塩化ナトリ

ウムが存在下に行なつて、菌体がメチレンブルーで明らかに染色されるに至らしめたのち、PH3.5〜7で自己消化させることを特徴とする菌体の自己消化法に存する。

本発明について以下に詳細に説明すると、本発明の自己消化法の対象となるものは種々の酵母や細菌などの生菌体である。

例えばサツカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サツカロマイセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)等のサツカロマイセス属酵母、キャンディダ・ウナリス(*Candida utilis*)、キャンディダ・トロピカリス(*Candida tropicalis*)等のキャンディダ属酵母、ビヒア・ミソ(*Pichia* miso)等の酵母及びブレヴィバクテリウム属(*Brevibacterium* sp.)やコリネバクテリウム属(*Corynebacterium* sp.)で代表されるアミノ酸発酵細菌等が原料として用いられる。これらの酵母や細菌は種々の発酵工業の副産物として得られたものを利用してもよく、また菌体生

- 3 -

産を目的として培養したものを用いてもよい。例えばビール工業の副産物であるビール酵母は、本発明方法の代表的な原料菌体である。これらの菌体は生菌体であることが必要である。生菌体は後述のメチレンブルー染色法で染色されないので容易に識別できる。もちろん生菌体中に若干のメチレンブルー染色法で染色され得る菌体を含んでいるものも本発明方法の原料とすることができる。従つて本発明方法の原料は実質的に生菌体であればよい。

本発明ではこれらの菌体を酸で処理する。酸処理はPH3.5以下で行なうが、酸処理に際し塩化ナトリウムを併用する場合にはPH3.5以下で行なえばよい。

酸処理は所定のPHの酸水溶液に菌体を懸濁させて若干攪拌するだけでよい。酸としては塩酸、硫酸等の無機酸及び酢酸、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸等の有機酸のいずれをも用いることができるが、通常は塩酸を使用する。

酸処理のPHが高いと、酸処理に長時間を要し、

- 4 -

かつ汚染菌の不活性化が不十分で、後続する自己消化中に腐敗を起すことがある。低いPHで酸処理を行なうと汚染菌の不活性化は良好であるが、同時に自己消化に必要な酵素の活性も損なわれ易い。従つて酸処理はPH0.5〜2.0で行なうのが好ましい。

なお、酸処理に際し塩化ナトリウムを併用すると、PHが若干高くても良好な酸処理を行なうことができる。従つて塩化ナトリウムを併用する場合にはPH1〜2.5で処理を行なうのが好ましい。

酸処理に際しては後続する自己消化が阻害されないように、すなわち菌体の酵素活性ができるだけ保存されるようにすることが重要である。従つて酸処理は低温で行なうことが好ましく、通常は0〜10℃、好ましくは5〜30℃で行なわれる。酸処理は菌体がメチレンブルー染色法により、明らかに染色されるようになるまで行なう。なおメチレンブルー染色法とは、酸処理した菌体懸濁液を水で希釈してスライドガラ

- 5 -

- 6 -

ス上に一滴とり、これにメチレンブルー液（メチレンブルー 0.02g を蒸留水 50 ml に溶解させた溶液と、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.01g と  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.70g を蒸留水 50 ml に溶解させた溶液とを一混合した溶液）を一滴加え、菌体が染色されたか否かを顕微鏡で観察する方法である。メチレンブルー染色法で明らかに染色されるようになったら、染色された菌体だけでなく未染色の菌体も既に変化しているので、酸処理を中止しても未染色の菌体は短時間のうちに染色されるに至る。通常は菌体の 50% 以上が染色されるまで酸処理を行なう。染色された菌体の比高は血球盤を用いることにより容易に算出することができる。

酸処理の時間は通常 1～60 分であり、酸性が強いほど、また温度が高いほど短時間の処理でよい。例えば pH 0.5 以下の強酸性では、通常 1 分未満の極めて短い時間で明らかに染色が認められる。処理時間が長いと酵素が失活するおそれがあるので、必要以上に長時間の処理をす

- 7 -

また、温度及び処理時間が同じならば、より高い pH で処理を行なうことができる。

塩化ナトリウムの濃度は菌体スラリー中に 1（重量）% 以上となるように添加するが、特に 3～5（重量）% となるように添加するのが好ましい。塩化ナトリウムの濃度を必要以上に高くすることは、得られる自己消化液中の食塩濃度が高くなり、その用途が制限されるので好ましくない。

なお、塩化ナトリウムは単独で添加する代りに、塩化ナトリウムを含むエキスの形で添加してもよい。例えば乾量基準で約 50（重量）% の塩化ナトリウムを含む蛋白質の酸分解物を添加すると、塩化ナトリウムのみを添加した場合よりも自己消化工程での防腐能が高まり、且つ自己消化液の味覚が一般と向上する。

酸処理が終了した菌体は、所望により遠心分離して酸水溶液の大部分を除去し、更に要すれば水洗したのち、直ちにアルカリを加えて pH を上げ次の自己消化を行なわせる。例えば原料菌体

るのは好ましくない。好ましい酸処理時間は 30 分以内である。特に pH 0.5～1.5 また、塩化ナトリウムを併用する場合には pH 1～2 で 10 分以内の処理が好ましい。

酸処理に際し塩化ナトリウムを併用する場合には、塩化ナトリウムは酸処理工程の初めから存在させてもよく、また途中で添加してもよい。通常は含水菌体に塩化ナトリウムを加えて自己溶解させたのち酸水溶液を加えてスラリーとするか、又は菌体を塩化ナトリウムを含む酸水溶液に懸濁させてスラリーとし、所定時間保持したのち苛性ソーダで中和して自己消化させる。また、菌体が多量の不純物を含んでいる場合には、菌体を酸水溶液に懸濁させたのち遠心分離機で大部分の酸水溶液を除去し、次いで残った菌体スラリーに塩化ナトリウムを添加して所定時間保持するのが好ましい。酸処理を塩化ナトリウムの存在下に行なうと、酸処理の効果が強く表われる。従つて pH 及び温度が同じならば、短時間の処理で菌体が染色されるようになる。

- 8 -

が多量の不純物を含む場合及び酸処理工程で多量の酸を使用したためそのまま中和したのでは得られる自己消化液中に許容量以上の塩類が混入する場合には、遠心分離を行なうのが好ましい。但し、酸処理に際し塩化ナトリウムを併用した場合には、酸処理スラリーをそのまま中和して自己消化を行なわせるのがよい。

なお、生菌体としてビール工業の副産物であるビール酵母を用いた場合には、自己消化液中にホップに由来すると考えられるにがみがあるが、酸処理を焼酎を用いて行ない、酸処理スラリーの中和を水酸化カルシウムを用いて行なうことにより、このにがみを除去することができる。これは飼料カルシウムが沈降する際に、にがみの成分を吸着することによるものと考えられる。

自己消化は酸処理の終了した菌体にアルカリを加え pH を 5～7 に調整しながら行なう。アルカリとしては苛性ソーダや炭酸ソーダが用いられる。自己消化は菌体を 3～5%（重量）% の懸濁液とし、若干攪拌しつつ 30～50℃、特に

- 10 -

- 9 -

30~50℃に保持することにより容易に行なうことができる。なお、自己消化中に液のPHは漸次低下するので、ときどき調整するのが好ましい。PH5~9の範囲外でも自己消化は進行するが、その速度は著しく遅い。従つて自己消化の實質的部分はPH5~9で行なわせる。

自己消化に要する時間は温度及び酸処理の条件によつても異なるが、通常10~30時間程度である。なお、自己消化に際しては、酸処理を経た菌体に食塩、グルタミン酸ソーダ、蛋白分解アミノ酸液、魚肉エキス、野菜エキス、肉エキス、酵母エキス等添加してもよい。これらの添加物を加えると、酸処理は経たが未だ未染色の菌体も速かに染色されて自己消化が均一に進行する。また自己消化液の浸透圧が高くなつて防腐能が向上する利点もある。添加量は通常、自己消化液中の濃度として1~数(重量)％程度で十分である。自己消化が終了したならば、加熱して酵素を失活させる。かくして得られた自己消化液は残渣を分離したのち濃縮して酵母

1字訂正

エキス等としてもよく、またそのまま濃縮して調味料とすることもできる。所望ならば濃縮に先立ち骨粉や他のエキス、油脂等を添加してもよい。

本発明方法によれば、食品添加物として許容されているものだけを用いて、腐敗をおこさせることなく自己消化を行なわせることができ、得られる自己消化液は風味にすぐれている。

次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

なお、実施例で用いたパン酵母は下記の方法により取得したものである。市販のパン酵母10gを水道水で4倍に希釈してスラリーとしたのち、遠心分離機で酵母を濃縮する操作を3回反復して、固形分1g(重量)の酵母を得た。糖(重量)％(糖としてはスクロースを分離した糖蜜を使用)、硫酸ノ(重量)％、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3(重量)％、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.1(重量)％、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05(重量)％、酵母エキス

1字加入

-11-

-12-

0.3(重量)％、ビタミンB<sub>6</sub> 10g/lの培地を加熱殺菌して、攪拌機を備えた100gの培養槽に仕込んだ。これに前記の固形分1gの酵母を投入し、アンモニア水でPHを5に保ちながら30℃で8時間培養し、酵母が分裂したことを確認した。次いで10℃で24時間静置培養を行なつたのち、遠心分離して酵母を回収した。酵母は5回水洗したのち塩心分離機で脱水して、固形分2.6(重量)％、乾物の粗蛋白質含量2.4(重量)％のパン酵母とした。

実施例1~4

パン酵母100gに水300gを加えてペースト状とし、1N塩酸で表1のPHとした。

表1に示す温度、時間酸処理したのち1N苛性ソーダを加え、PH6.5~8.3、35~40℃で16時間自己消化させた。自己消化液はPH6.0に調整し、水を加えて500gとし、95~99℃に5分間保持した。遠心沈降管で上澄液と沈澱とに分離し、沈澱は水を加えて500gとしたのち再び遠心沈降管で上澄液と沈澱とに

分離した。沈澱の乾物重量を測定し、酵母の乾物重量の何％が自己消化により菌体外に抽出されたかを算出した。結果を表1に示す。

表 1

No.	酸 処 理				エキス抽出率(%)
	PH	処理時間(分)	処理温度(℃)	メチレンブルー染色率(%)	
1	3.3	40	35	90以上	37
2	2.0	40	35	80以上	41
3	1.2	30	30	90以上	39
4	0.1	10	30	90以上	37

実施例5~6

パン酵母100gに塩化ナトリウム5gを加えて自己溶解させた。次いで1N塩酸で表1のPHとした。以下、実施例1と全く同様に処理して表1の結果を得た。

-13-

-14-

表 - 3

No.	処 理				エキス抽出率 (%)
	PH	処理時間 (分)	処理温度 (℃)	メチレンブルー染色 率 (%)	
5	2.5	10	30	80 以上	41
6	1.5	10	30	90 以上	47

## 実施例 7

ビール煎糖酵母(固形分13(重量)%)  
に6N-塩酸を加えてPH1.0とし、20℃で  
10分間保持した。メチレンブルー染色率は  
90%以上であつた。次いで6N-苛性ソーダ  
でPH3.5に調整し、38~40℃で24時間自  
己消化させたエキス抽出率は49%であつた。

## 実施例 8

パン酵母1kgにG-メ度3.5の異性化糖液  
60gを添加した。これに3N-酢酸、3M-  
クエン酸及び3M-リゾゴ酸の等容量混合液を  
添加してPH3.4とし、25℃で30分間保持し

た。メチレンブルー染色率は90%であつた。  
次いで6N-苛性ソーダと6N-苛性カリとの  
等容量混合物でPH6.5とし、45℃で16時間  
自己消化を行なわせた。エキス抽出率は41%  
であつた。

## 実施例 9

ビール酵母(固形分13(重量)%)400g  
に1N-塩酸を加えてPH2.5とし、24℃で  
20分間放置した。メチレンブルー染色率は約  
40%であつた。これを遠心沈降機で処理して  
上澄液を捨て、酵母スラリー(固形分24(重  
量)%)150gを得た。これに炭白質を酸で  
分解して得たアミノ酸粉末(食塩58(重量)  
%)、アミノ酸その他42(重量)%)を7.5g  
添加して60分間放置した。メチレンブルー染  
色率は約90%であつた。このスラリーに水を加  
えて全量を240gとし、苛性ソーダを加えて  
PH3.5として、40℃で30時間自己消化を  
行なわせた。エキス抽出率は52%であつた。

1字訂正